



TITLE:

# 麻酔薬による遺伝子発現調節の分子機構と全身麻酔における意義に関する研究

AUTHOR(S):

福田, 和彦

---

CITATION:

福田, 和彦. 麻酔薬による遺伝子発現調節の分子機構と全身麻酔における意義に関する研究. 2004

ISSUE DATE:

2004-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/84665>

RIGHT:

学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。

麻醉薬による遺伝子発現調節の分子機構と  
全身麻酔における意義に関する研究

(研究課題番号 1 3 3 0 7 0 4 6)

平成13－15年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (A) (2)) 研究成果報告書

平成16年 3月

研究代表者 福田 和彦

(京都大学大学院医学研究科教授)

京 都 大 学 図 書



1040940381

附 属 図 書 館

はしがき

「麻酔薬による遺伝子発現調節の分子機構と全身麻酔における意義に関する研究」は科学研究費補助金（基盤研究(A)(2)、課題番号13307046）を受けた研究計画に基づいて、平成13－15年度の3年間に実施されたもので、この冊子は本研究成果をとりまとめたものである。3年間にわたり科学研究費補助金を与えられたことに対し、深く謝意を表すものである。

平成16年3月

京都大学大学院医学研究科

福田 和彦



研究組織

研究代表者： 福田和彦（京都大学大学院医学研究科 教授）  
 研究分担者： 難波恒久（京都大学大学院医学研究科 助手）  
 古谷秀勝（京都大学大学院医学研究科 助手）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	16,900	5,070	21,970
平成14年度	14,200	4,260	18,460
平成15年度	10,500	3,150	13,650
平成 年度			
平成 年度			
総計	41,600	12,480	54,080

## 研究発表

### 原著論文

1. Hirota, K., Murata, M., Itoh, T., Yodoi, J. and Fukuda, K.: An endogenous redox molecule, thioredoxin, regulates transactivation of epidermal growth factor receptor and activation of NF- $\kappa$ B by lysophosphatidic acid. FEBS Lett. 489, 134-138 (2001).
2. Hirota, K., Murata, M., Itoh, T., Yodoi, J. and Fukuda, K.: Redox-sensitive transactivation of epidermal growth factor receptor by tumor necrosis factor confers the NF- $\kappa$ B activation. J. Biol. Chem. 276, 25953-25958 (2001).
3. Shoda, T., Fukuda, K., Uga, H., Mima, H. and Morikawa, H.: Activation of  $\mu$ -opioid receptor induces expression of c-fos and junB via mitogen-activated protein kinase cascade. Anesthesiology 95, 983-989 (2001).
4. Itoh, T., Namba, T., Fukuda, K., Semenza, G.L. and Hirota, K.: Reversible inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by exposure of hypoxic cells to the volatile anesthetic halothane. FEBS Lett. 509, 225-229 (2001).
5. Shichino, T., Murakawa, M., Adachi, T., Miyazaki, Y., Segawa, H., Fukuda, K. and Mori, K.: Effects of xenon on acetylcholine release in the rat cerebral cortex *in vivo*.

- Br. J. Anaesth. 88, 866-868 (2002).
6. Fukuda, K., Shoda, T., Mima, H. and Uga, H.: Midazolam induces expression of c-Fos and EGR-1 by a non-GABAergic mechanism. Anesth. Analg. 95, 373-378 (2002).
  7. Fukuda, K., Uetsuki, N., Uga, H., Hashiguchi, M., Sato, M., Hisano, T., Segawa, H. and Iwasaki, Y.: Potentiation of proopiomelanocortin gene expression in cultured pituitary cells by benzodiazepines. Anesthesiology 98, 1172-1177 (2003).
  8. Hashiguchi-Ikeda, M., Namba, T., Ishii, T. M., Hisano, T. and Fukuda, K.: Halothane inhibits an intermediate conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel by acting at the extracellular side of the ionic pore. Anesthesiology 99, 1340-1345 (2003).
  9. Kasuno, K., Takabuchi, S., Fukuda, K., Kizaka-Kondoh, S., Yodoi, J., Adachi, T., Semenza, G. L. and Hirota, K.: Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. J. Biol. Chem. 279, 2550-2558 (2004).
  10. Itoh, T., Hirota, K., Hisano, T., Namba, T. and Fukuda, K.: The volatile anesthetics halothane and isoflurane differentially modulate pro-inflammatory cytokines-induced p38 mitogen-

activated protein kinase activation.

J. Anesth. in press.

11. Takabuchi, S., Hirota, K., Kasuno, K., Nishi, K., Oda, S., Shingu, K., Takabayashi, A., Adachi, T., Semenza, G. L., and Fukuda, K.: The nitrates nitroglycerine, isosorbide dinitrate, and sodium nitroprusside differentially modulate hypoxia-inducible factor 1-mediated cellular hypoxia-induced gene expressions.  
Anesth. Analg. submitted.
12. Takabuchi, S., Hirota, K., Nishi, K., Oda, S., Shingu, K., Takabayashi, A., Adachi, T., Semenza, G. L., and Fukuda, K.: Molecular mechanism of suppressive effects of propofol on cellular hypoxic responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. Anesth. Analg. submitted.

## 口頭発表

1. 難波恒久、池田光子、石井孝広、福田和彦： 揮発性麻酔薬の Ca 依存性の K チャネルへの作用と分子機序.  
第 48 回日本麻酔科学会総会（神戸）（2001）.
2. 宇賀久敏、福田和彦、正田丈裕、美馬裕之： ミダゾラムは PC12 細胞に置いて c-FOS と EGR-1 の発現を誘導する.  
第 48 回日本麻酔科学会総会（神戸）（2001）.
3. 正田丈裕、福田和彦： 麻酔関連薬物による遺伝子発現の変化.

第49回日本麻酔科学会総会（福岡）（2002）．

- 4．難波恒久、池田光子、福田和彦：  
カルシウム依存性カリウムチャネルに対する揮発性麻酔薬の作用メカニズム． 第49回日本麻酔科学会総会（福岡）（2002）．
- 5．伊藤辰哉、廣田喜一、難波恒久、福田和彦： ハロタンは低酸素による HIF-1 活性化を抑制する．  
第49回日本麻酔科学会総会（福岡）（2002）．
- 6．宇賀久敏、正田丈裕、美馬裕之、福田和彦： ミダゾラムは PC12 細胞において ERK を活性化する．  
第49回日本麻酔科学会総会（福岡）（2002）．
- 7．瀬川一、森健次郎、福田和彦： ミダゾラムが下垂体ホルモンスレス反応に及ぼす影響．  
第49回日本麻酔科学会総会（福岡）（2002）．
- 8．難波恒久、池田光子、福田和彦： エタノールによる Ca 依存性 K チャネルの抑制．  
第20回麻酔メカニズム研究会（大阪）（2002）
- 9．高淵聡、廣田喜一、福田和彦： 低酸素誘導性遺伝子発現に及ぼすプロポフォールの影響．  
日本麻酔科学会第50回学術集会（横浜）（2003）
- 10．宇賀久敏、福田和彦、植月信雄、瀬川一： ベンゾジアゼピンは下垂体細胞におけるプロオピオメラノコルチン遺伝子発現を増強する． 日本麻酔科学会第50回学術集会（横浜）（2003）
- 11．Mima, H., Shoda, T., Uga, H. and Fukuda, K.:  
Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  channel by fentanyl via the



cloned  $\mu$ -opioid receptor expressed in NG108-15 cells. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists (New Orleans) (2001).

- 1 2. Namba, T., Ikeda, M. and Fukuda, K.: Halothane acts on the pore domain of a human  $\text{Ca}^{2+}$ -activated K channel, IK, from outside. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists (Orlando) (2002).
- 1 3. Mukaida, K., Shichino, T., Miyazaki, Y. and Fukuda, K.: Neurochemical basis of isoflurane anesthesia: involvement of serotonergic system. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists (San Francisco) (2003).
- 1 4. Himukashi, S., Miyazaki, Y. and Fukuda, K.: Anesthetic actions of volatile anesthetics and the nociceptin system. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists (San Francisco) (2003).
- 1 5. Shoda, T., Fukuda, K., Uetsuki, N., Uga, H., and Segawa, H.: Potentiation of proopiomelanocortin gene expression by local anesthetics. 13th World Congress of Anaesthesiologists (Paris) (2004).
- 1 3. Fukuda, K.: Basic pharmacology of opioid. The 3rd Congress of the Asian Oceanic Society for IntraVenous Anesthesia (Seoul) (2001)

14. Fukuda, K.: Opioid receptors-An update.

11th Asian Australasian Congress of  
Anaesthesiologists (Kuala Lumpur) (2002)

## 研究成果

### 1. はじめに

従来の麻酔薬の中樞神経系に関する研究は、主に電気生理学的な方法を用いて進められてきた。その結果、脳波、誘発電位等に対する麻酔薬の影響は、各麻酔薬について詳細に記載されている。一方、麻酔薬の作用機構に関する研究は、近年の分子生物学的方法の導入により進歩し、揮発性麻酔薬（ハロタン、イソフルラン、セボフルランなど）は GABAA 受容体の作用を増強することが明らかにされてきた。しかしながら、これらの麻酔薬の作用機序が完全に解明されたとは言い難い。

このような従来の研究は麻酔薬の急性作用に注目したものが大部分であり、麻酔薬により生体に引き起こされる長期的な変化に関する研究、あるいは遺伝子発現に及ぼす影響に関する研究は報告されていない。麻酔薬は GABA<sub>A</sub> 受容体以外にも多くの受容体、イオンチャネル、酵素に影響を及ぼすことが報告されており、遺伝子発現に何らかの影響を及ぼす可能性は十分に予想される。遺伝子発現様式の変化によってもたらされる各種蛋白の質的あるいは量的な変化が、神経細胞の機能的変化（たとえば、シナプス伝達効率の変化、神経細胞の興奮性の変化）に至り、麻酔薬による神経系全体の機能の修飾に関与する可能性もある。

本研究では、分子生物学的手法を駆使して、麻酔薬によって発現量に変化する遺伝子を同定し、その遺伝子がコードする蛋白の機能を検討することを目標としており、従来の研究にはなかった観点から麻酔薬の作用を検討するものである。本研究で得られる成果によって、従来ほとん

ど注目されていなかった麻酔薬による遺伝子発現様式の変化、全身麻酔後の長期的な神経機能の変化についての理解が深まることが期待される。また、これらの新しい知見は、日常臨床における新しい麻酔管理法の開発に発展する可能性がある。

## 2. オピオイド受容体の活性化による遺伝子発現様式の変化

臨床で広く用いられているモルヒネを代表とする麻薬性鎮痛薬は主に、 $\mu$ オピオイド受容体に作用することが知られている。我々は、クローン化したラット $\mu$ オピオイド受容体の cDNA を CHO 細胞に導入することによって本受容体を高密度に発現する細胞株 CROR-B22 を作成し、この細胞株を用いて、オピオイド受容体を介する遺伝子発現様式の変化とその分子機構を検討した。

CROR-B22 細胞をモルヒネあるいは合成ペプチド DAMGO で刺激し、RNA を調製して Northern 解析を行った。その結果、*c-fos* の RNA が刺激後 10 分から検出され、30 分を最大として、90 分後にはほぼ刺激前のレベルまで回復することが明らかになった。一方、*junB* の RNA は刺激後 30 分を最大とするが、90 分後でもほとんど低下しないことが示された。 $\mu$ オピオイド受容体を介する *c-fos* と *junB* の RNA 発現は、百日咳毒素あるいは ERK (MAPK の一種) 活性化経路の阻害薬である PD98059 で抑制されることから、百日咳毒素感受性 G 蛋白 ( $G_i$  あるいは  $G_o$ ) と ERK を介することが示唆された。

次に、ERK を介する *c-fos* と *junB* 遺伝子の転写亢進機構として、転



写因子 Elk-1 の関与について検討した。Elk-1 が結合する塩基配列を有するプラスミドを用いたレポーターアッセイにより、CROR-B22 細胞をモルヒネあるいは DAMGO で刺激すると、Elk-1 を介する転写活性が誘導され、この誘導は百日咳毒素あるいは PD98059 により阻害されることが明らかになった。

さらに  $\mu$ オピオイド受容体の活性化による *c-fos* あるいは *junB* 遺伝子の転写誘導の意義を明らかにするために、転写因子 AP-1 活性を検討した。その結果、*c-fos* あるいは *junB* 遺伝子産物が転写因子 AP-1 を形成し、他遺伝子の転写を誘導する可能性が示唆された。

以上の結果は、麻薬により  $\mu$ オピオイド受容体が活性化されると、ERK と Elk-1 を介して、*c-fos* あるいは *junB* 遺伝子の発現が誘導され、これらの遺伝子産物が他遺伝子の転写を促進する可能性があることを示唆したものである。

### 3. 麻酔関連薬物による遺伝子発現の変化に関する研究

#### 1) 静脈麻酔薬による遺伝子発現の誘導

静脈麻酔薬投与による神経細胞機能の長期的変化、中でも遺伝子発現様式の変化についての研究は、今までほとんど行われていなかった。

我々は、神経細胞のモデルとしてラット褐色細胞腫由来細胞株 PC12 を用いて、臨床的に用いられている各種静脈麻酔薬による immediate early gene (IEG) 発現誘導を検討した。PC12 細胞に、thiopental、ketamine、propofol、midazolam、diazepam を作用させたところ、

midazolam によってのみ 2 種類の IEG、*c-fos* と *Egr-1* の産物が immunoblot 法によって検出された。Midazolam により誘発される IEG 発現は、benzodiazepine 受容体の拮抗薬 flumazenil あるいは PK11195 によって抑制されなかった。また、GABAA 受容体作動薬である GABA や muscimol を PC12 細胞に作用させても、IEG 誘導は観察されなかった。これらの結果は、midazolam による IEG 発現誘導は、その鎮静作用や抗不安作用とは異なり、GABAA 受容体あるいは benzodiazepine 受容体を介するものではないことを示唆している。

Midazolam による IEG 発現誘導は、PD98059 により抑制され、ERK を介する反応であることが示唆された。実際に、immunoblot 法あるいは免疫沈降法で ERK 活性を検討すると、midazolam 投与により、ERK 活性が上昇することが明らかになった。Midazolam による ERK 活性化の機序としては、tyrosine kinase と epidermal growth factor 受容体が関与することがわかったが、詳細は不明である。また、midazolam による遺伝子発現の変化が生体において有する意義については、今後の研究課題である。

## 2) 静脈麻酔薬によるプロオピオメラノコルチン遺伝子発現の増強

視床下部－下垂体－副腎皮質 (HPA) 系は、外科的侵襲を初めとするストレスに対する生体の恒常性維持において中心的な役割を果たしている。生体にストレスが加わると、視床下部から分泌される CRH が下垂体前葉に作用して ACTH が分泌される。ACTH は副腎皮質に作用して

グルココルチコイドを分泌させる。ACTH の分泌調節については多くの研究が報告されており、CRH、vasopressin、catecholamine、サイトカインなどのより調節されていることが知られている。下垂体を介するストレス反応に対して各種の麻酔薬が及ぼす影響についても、主に動物実験の成績が報告されている。HPA 系を介するストレス反応に対してベンゾジアゼピン系薬物 (BDZ) が及ぼす影響については、これまでの報告では一致した見解が得られていない。本研究では、ACTH の前駆体であるプロオピオメラノコルチン (POMC) の遺伝子発現を指標として、BDZ が下垂体を介するストレス反応に及ぼす影響について検討した。

まず、POMC プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子を連結した DNA を導入された下垂体腫瘍細胞株 (AtT20PL) を使用し、種々の条件下で細胞を刺激して、細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定した。BDZ 非存在下では、CRH 刺激 ( $1 \mu\text{M}$ 、 $37^\circ\text{C}$ 、5 時間) はルシフェラーゼ活性を非刺激時の  $1.5 \pm 0.1$  倍 ( $n = 8$ ) に上昇させた。ジアゼパム ( $100 \mu\text{M}$ )、ミダゾラム ( $100 \mu\text{M}$ ) 存在下では、CRH はルシフェラーゼ活性をそれぞれ非刺激時の  $5.1 \pm 1.4$  倍 ( $n = 5$ )、 $3.6 \pm 0.9$  倍 ( $n = 5$ ) に上昇させた。この BDZ による POMC 遺伝子発現増強作用は BDZ 受容体拮抗薬フルマゼニル、PK11195 には影響されなかった。Protein kinase A (PKA) 阻害薬である H89 存在下では、BDZ による増強は認められなかった。また、ホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害薬であるイソブチルメチルキサンチンによるルシフェラーゼ活性誘導は BDZ により増強されなかった。

次に、cyclic AMP 放出に対する作用を検討した。CRH 刺激による cyclic AMP 放出の増加はジアゼパムあるいはミダゾラムによりさらに増加すること、イソブチルメチルキサンチン存在下では BDZ の作用は認められないことが明らかになった。

以上の結果は、下垂体細胞において BDZ は中枢性あるいは末梢性 BDZ 受容体の関与しない機序を介して、PDE 阻害によって細胞内 cyclic AMP を増加し、CRH による POMC 遺伝子発現誘導を増強することを示唆している。

### 3) その他の薬物によるプロオピオメラノコルチン遺伝子発現の変化

周術期使用薬物が POMC 遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。その結果、局所麻酔薬と Ca チャネル拮抗薬は CRH を介する POMC 遺伝子発現を増強することが明らかになった。今後、その機序について検討する予定である。

## 4. 吸入麻酔薬の作用に関する研究

### 1) 揮発性吸入麻酔薬の K<sup>+</sup>チャネルに対する作用

揮発性麻酔薬は様々なイオンチャネルの機能に影響を及ぼすことが知られている。ニコチン性アセチルコリン受容体や GABA<sub>A</sub> 受容体に代表されるリガンド依存性イオンチャネルでは、ハロタンなどの揮発性麻酔薬はチャネルのイオン孔もしくはその近傍に結合することによって、チャネル機能に影響を及ぼすと考えられている。これに対して、リガンド



依存性イオンチャネル以外のイオンチャネルに対する揮発性麻酔薬の作用機序についてはほとんど解明されていない。

カルシウム依存性カリウムチャネル ( $K_{Ca}$ ) は細胞内カルシウム濃度に依存して膜電位を変化させるチャネルであり、種々の細胞の機能調節に大きな役割を果たしている。 $K_{Ca}$  は 6 カ所の膜貫通領域と 1 つのイオン孔領域を有するサブユニットからなる 4 量体であり、サブユニットとして  $Sl\alpha$ 、IK、SK1、SK2、SK3 の cDNA が単離されている。 $K_{Ca}$  の種類によって揮発性麻酔薬に対する感受性が異なり、BK はカルシウム濃度依存性に、IK はカルシウム濃度非依存性に揮発性麻酔薬により機能が抑制されるが、SK は影響を受けない。本研究では、揮発性麻酔薬の IK 抑制作用の分子機構を解明するため、IK とアミノ酸配列の相同性が高い SK1 に揮発性麻酔薬に対する感受性がないことに着目し、IK と SK1 のキメラチャネルを作成して揮発性麻酔薬の作用を検討した。

まず、野生型チャネル IK および SK1、各キメラチャネルをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、そのチャネル電流をパッチクランプ法を用いて  $10\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  存在下で測定した。その結果、イオン孔領域が IK 由来であるキメラチャネルの電流はハロタンにより抑制されたが、同部位が SK 由来のチャネルでは抑制されないことが明らかになった。

次に、IK ならびにイオン孔領域が IK 由来のキメラチャネルに関して、ハロタンによるチャネル電流抑制の時定数をインサイドアウトパッチとアウトサイドアウトパッチで比較した。その結果、ハロタンが細胞外から作用する場合は細胞内から作用する場合に比べて有意に速くチャネル

電流を抑制することが明らかになった。

以上の結果は、揮発性麻酔薬ハロタンは細胞外から IK チャネルのイオン孔近傍に作用してチャネル機能を抑制することを示唆している。IK はリンパ球の増殖、好中球における貪食作用や殺菌作用、血小板のカルシウムシグナル伝達、血管内皮細胞由来過分極因子を介する血管平滑筋弛緩作用などに関与している。本研究の成果は、IK に対する揮発性麻酔薬の作用機序の解明と、揮発性麻酔薬の及ぼす様々な副作用の発生機序の解明に寄与することが期待される。

## 2) 揮発性麻酔薬の神経伝達物質放出に及ぼす影響

### A. 大脳皮質アセチルコリン放出に対するキセノンの作用

従来、全身麻酔では、古典的な吸入麻酔薬である亜酸化窒素を用いることが多かった。しかしながら、亜酸化窒素には骨髄抑制、脊髄神経症などを誘発する危険性があること、地球のオゾン層に悪影響を及ぼす可能性があることが認識されてきた。そこで、最近、キセノンを全身麻酔薬として応用することが注目されている。キセノンに麻酔作用があることは以前から知られていたが、その機序に関する知見は少ない。

我々は、ラット大脳皮質におけるアセチルコリン放出を *in vivo* で microdialysis 法によって測定し、各種吸入麻酔薬のアセチルコリン放出に及ぼす影響を検討してきた。今までに、揮発性麻酔薬（セボフルラン、イソフルラン）はアセチルコリン放出を抑制するが、亜酸化窒素はそれを増加させることを示した。今回、キセノンについて同様の解析を

行い、キセノンはラット大脳皮質におけるアセチルコリン放出を増加させることが明らかになった。このことはキセノンは亜酸化窒素と同様に、揮発性麻酔薬とは異なり、興奮性麻酔薬に分類されることを示唆している。また、以上の知見は、セボフルランやイソフルランと異なり、亜酸化窒素やキセノンは鎮痛作用の強い吸入麻酔薬であることとも関係する可能性がある。

#### B. 大脳皮質セロトニン放出に対する揮発性麻酔薬の作用

大脳皮質におけるセロトニンの放出は覚醒時に多く、徐波睡眠時には低下することが知られており、意識レベルの調節に関与すると推測されている。本研究では、臨床的に広く使用されている揮発性吸入麻酔薬の作用を神経化学的に解析することを目的として、大脳皮質におけるセロトニンの放出を microdialysis 法により検出し、揮発性麻酔薬イソフルランの影響を検討した。

イソフルラン 0.5MAC (0.75%)、1.0MAC (1.5%)、1.5MAC (2.25%) を投与すると、前頭葉皮質におけるセロトニン放出量は徐波睡眠時と同レベルまで低下することが明らかになった。MAC (最小肺泡濃度) は、侵害刺激に対する体動反応抑制に関する麻酔薬の効力の指標である。我々の結果は、イソフルランは侵害刺激に対する体動反応を抑制するよりも低い濃度で前頭葉皮質におけるセロトニン放出を抑制することを示している。一方、セロトニン再取り込み阻害薬 fluoxetine を投与してセロトニンの局所濃度が高くなると、righting reflex 消失に要す

るイソフルラン濃度は高くなることが明らかになった。

以上の結果は揮発性麻酔薬イソフルランは脳皮質におけるセロトニン放出を抑制することを示しており、この作用はイソフルランの侵害反応抑制作用ではなく意識レベルに対する作用と関係することが示唆された。

## 5. サイトカインによる p38MAPK 誘導に対する揮発性麻酔薬の作用

揮発性麻酔薬は中枢神経系以外の心血管系、免疫系に対しても作用を及ぼすことが知られているが、その機序は不明である。我々は TNF、IL-1 などの炎症性サイトカインあるいは lipopolysaccharide (LPS) による p38MAPK 活性化に対する揮発性麻酔薬の作用を検討した。その結果、揮発性麻酔薬ハロタンとイソフルランは LPS あるいは TNF による p38MAPK の活性化を促進するが、逆に IL-1 による p38MAPK 活性化を抑制することが明らかになった。p38MAPK は多くの蛋白の発現調節に関係しており、我々が得た知見は揮発性麻酔薬が遺伝子発現調節を介して細胞機能に影響を及ぼす可能性を示唆している。

## 6. Hypoxia-inducible factor 1 を介する細胞応答に対する麻酔関連薬物の作用

生体が低酸素状態におかれると、代謝や遺伝子発現の変化を初めとする種々の細胞応答が引き起こされる。たとえば、低酸素状態では電子伝



達系構成要素の遺伝子発現は抑制され、解糖系酵素の遺伝子発現は活性化される。また、エリスロポイエチン、血管内皮成長因子 (VEGF)、誘導性一酸化窒素合成酵素の発現は低酸素により誘導される。これらの低酸素により引き起こされる遺伝子発現応答は、転写因子 hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) を介することが知られている。低酸素状態から生体を守ることは、麻酔科学、集中治療医学の大きな目標の一つであり、HIF-1 を介する遺伝子発現応答に対する各種薬物の作用を検討することは臨床的意義も大きいと思われる。

#### 1) 揮発性麻酔薬ハロタンによる HIF-1 活性化の可逆的抑制

ヒト肝癌由来細胞株 HepG3 を用いて、低酸素による HIF-1 の増加および HIF-1 依存性遺伝子発現応答に対する揮発性麻酔薬ハロタンの作用を検討した。HepG3 を低酸素 (1%) に曝露すると、HIF-1 の構成要素である HIF-1 $\alpha$ が増加することが immunoblot により明らかになった。また、解糖系酵素 enolase 1 および VEGF のプロモーターに HIF-1 が結合することによる転写が reporter assay により示された。これらの反応は揮発性麻酔薬ハロタンにより可逆的に抑制された。

#### 2) 亜硝酸剤による HIF-1 誘導遺伝子発現の修飾

一酸化窒素 (NO) が HIF-1 活性に影響を及ぼすことは示されているが、NO を発生することにより作用すると考えられる亜硝酸剤が HIF-1 を介する遺伝子発現調節にどのように影響するかは明らかではなかった。

Nitroglycerine (NTG)、isosorbide dinitrate (ISDN)、sodium nitroprusside (SNP) について検討した結果、SNP は低酸素による HIF-1 $\alpha$  の蓄積を抑制し、HIF-1 活性化を低下させることが明らかになった。NTG と ISDN については、このような作用は認められなかった。この知見の臨床的意義については、さらなる検討が必要である。

### 3) HIF-1 を介する低酸素応答に及ぼす静脈麻酔薬プロポフォールの作用

静脈麻酔薬プロポフォールの HIF-1 活性化に及ぼす影響について検討した。プロポフォールは、HIF-1 $\alpha$  の産生を抑制することによって低酸素による HIF-1 蛋白の蓄積を低下させ、低酸素による遺伝子発現応答を抑制することが明らかになった。

## 7. 総括

本研究では、麻薬性鎮痛薬の作用点であるオピオイド受容体による遺伝子発現調節機構、静脈麻酔薬による遺伝子発現誘導、下垂体細胞におけるストレス反応に対する麻酔関連薬物の作用について解析し、周術期に使用される薬物が遺伝子発現の調節を介して各種細胞の機能に影響を及ぼす可能性を示した。さらに、全身麻酔薬としてもっとも広く用いられる吸入麻酔薬については、イオンチャネルに対する作用、神経伝達物質放出に及ぼす作用を解析することにより、麻酔薬としての作用機構を解明することを目標とする研究を行うとともに、サイトカインに対する

細胞応答に対する修飾作用について検討した。また、低酸素により引き起こされる細胞応答に対する麻酔関連薬物の作用を転写因子の観点から解析した。

従来、麻酔臨床で用いられる薬物の多くは、即効性と可逆性を有することが特徴的で、それらによる長期的効果については注目されていなかった。我々が得た知見は全身麻酔により遺伝子発現を介して長期的な細胞機能の変化が生じる可能性を示すものであり、今後は細胞レベルでのさらなる研究とともに、個体レベルにおけるこれらの細胞応答の意義を明らかにすることが必要である。